

Response microorganisms to soil contamination with heavy metals

Odpowiedź mikroorganizmów na zanieczyszczenie gleby metalami ciężkimi

Grażyna KACZYŃSKA^{1*}, Aneta LIPIŃSKA¹, Jadwiga WYSZKOWSKA¹ and Jan KUCHARSKI¹

¹ Katedra Mikrobiologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie *correspondence
grazyna.kaczynska@uwm.edu.pl

Abstract

The main aim of our work was to evaluate the effect that the soil contamination with zinc, copper and cadmium has on the number of (CFU) *Azotobacter*, organotrophic bacteria and *Streptomyces*. The results of the experiment revealed their role in the CFU modification and the impact on the level of soil contamination with heavy metals. Organotrophic bacteria have a similar tolerance to the heavy metals as *Streptomyces*, since the lowest resistance characterizes the *Azotobacter*. The toxicity of the examined heavy metals can be ranked as follows (from the most sensitive to the least): *Azotobacter* > organotrophic bacteria > *Streptomyces*. It can be concluded that the succession of the microorganisms is determined by the soil fertility, which stimulates both the characteristics and biochemical transformations, that occur in it through the mechanisms involved in reducing the negative impact of the heavy metals on the number of microorganisms.

Keywords: cadmium, copper, number of microorganisms, soil, zinc

Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu zanieczyszczenia gleby cynkiem, miedzią i kadmem na liczebność bakterii organotroficznych, promieniowców z rodzaju *Streptomyces* oraz bakterii z rodzaju *Azotobacter*. Wyniki eksperymentu wykazały wpływ testowanych metali ciężkich na liczebność badanych mikroorganizmów. Istotny okazał się zarówno poziom zanieczyszczenia jak i czas ekspozycji. Zarówno bakterie organotroficzne jak i promieniowce, wykazały podobny zakres tolerancji na metale ciężkie. Najmniejszą opornością charakteryzowały się bakterie z rodzaju *Azotobacter*. Wrażliwość drobnoustrojów względem badanych soli metali ciężkich można uszeregować w następujący sposób (od najbardziej wrażliwych): *Azotobacter* > bakterie organotroficzne > promieniowce z rodzaju *Streptomyces*. Liczebność mikroorganizmów glebowych uwarunkowana jest żyznością gleby, która działa stymulująco na przemiany biochemiczne w niej zachodzące poprzez mechanizmy warunkujące zmniejszenie negatywnego działania metali ciężkich.

Słowa kluczowe: cynk, gleba, kadm, liczebność mikroorganizmów, miedź

Detailed abstract

Soil is one of the most important factors involved in every processes occurring in the natural environment, the home for countless number of living organisms and the mediator between microbes and plants (Baćmaga, et al., 2007). The development of the civilization and technology deepens the degradation of the environmental components, as well as the toxic effect on the soil (Wyszkowska and Kucharski, 2003a, b). The intensification of the industry introduces enormous areas of the contaminants. The agronomically obsolete processes inhibit the mechanisms occurring in the arable soil by reducing the fertility (Baćmaga, et al., 2007). The plant protection products were, for many years, introduced to the environment in the amount far higher than the standards set by legislation. The side effects, caused by the excessive levels of the trace elements, are a serious threat not only to the flora, but also fauna of the soil (Gorlach and Gambuś, 2000). They distort the flow of matter and energy in the nature and leave their mark in the food chain (Wyszkowska and Kucharski, 2003a, b). The heavy metals generated into the environment disrupt biochemical changes and impair the biological activity of the soil. The toxicity of heavy metal salt is usually manifested in a decreased number of changes in soil microbial enzymatic activity. Biological imbalance in the soil environment exhibits a visible reduction in the amount of available to the plant roots, which is associated largely with the quality and quantity of harvested crops (Wyszkowski and Wyszkowska, 2004). The paper presents the problem of the impact of zinc, copper and cadmium on the number of soil microorganisms: *Azotobacter*, organotrophic bacteria and *Actinomyces*. The experiment was carried out in laboratory conditions. The assessment of the impact of different doses of the heavy metals on populations of the selected groups of soil microorganisms was carried out in the experiment multifactorial. The outline of the experiment concerned the following facilities, conducted in triplicate. Experimental variables were the type of salt used heavy metal, the time of incubation of soil samples. The sandy loam with pH 6.6 taken from the topsoil Center for Teaching and Testing in Tomaszkowo was studied. Solutions of the tested heavy metals salts were prepared in accordance with the objectives of the experiment, the concentrations of respectively: 120, 240, 480 mg*kg⁻¹ D.M. soil. The soil was mixed with aqueous solutions of the heavy metals salt, transferred to a glass container and placed in an incubator at a constant temperature of 25°C. During the incubation, samples of soil moisture was maintained at 50% of capillary water capacity. Microbiological analyzes were carried out after: 7, 70, 140 and 280 days after the establishment of the experiment. The contamination of the soil samples with doses of zinc, copper and cadmium in quantities of: 0, 120, 240, 480 mg kg⁻¹ D.M. of the soil and incubateing them for: 7, 70, 140, 280 days resulted in a highly significant change in the number of study groups of microorganisms, such as: *Azotobacter*, organotrophic bacteria, *Actinomyces*. Among the examined variables, which were the incubation time and the increased heavy metal contamination, the main factor limiting the number of soil microorganisms was the increased heavy metal contamination. The most negative effect was observed on *Azotobacter*>organotrophic bacteria >*Actinomyces*.

Keywords: cadmium, copper, number of microorganisms, soil, zinc

Introduction

Żyzność gleby determinowana jest w dużej mierze poprzez dostępność pierwiastków biogennych, zawartość materii organicznej oraz stosunki powietrzno-wodne (Boros i in., 2010). Mikroorganizmy glebowe odpowiadają za szereg przemian biochemicznych, decydują o dekompozycji materii organicznej zarówno pochodzenia biologicznego jak i tej, dostającej się do gleby (Brzezińska, 2009). Rola mikroorganizmów nie zamyka się tylko na procesach katabolicznych. Uwalniają składniki pokarmowe z trudno dostępnych połączeń mineralnych w formy przyswajalne dla roślin, m.in. poprzez uczestniczenie w procesach utleniania i redukcji zachodzących w glebie. Poza tym wytwarzają szereg substancji biologicznie czynnych jak: enzymy, witaminy, aminokwasy, substancje wzrostowe czy antybiotyki (Florencka i Chmiel, 2005). Dzięki umiejętności syntezy związków chemicznych, na przykład o charakterze inhibitorów, drobnoustroje oddziałują na rozwój fauny i flory glebowej (Wyszkowska i Kucharski, 2003a, b). Mają bezpośredni wpływ na prawidłowe funkcjonowanie środowiska poprzez regulację procesów transformacji i mineralizacji naturalnych komponentów oraz ksenobiotyków (Schloter, i in., 2003). Nieumiejętne gospodarowanie zasobami naturalnymi prowadzi do zachwiania równowagi w składzie gatunkowym edafonu, jak również zmienia właściwości fizykochemiczne gleby. Zaburzenia powodowane są poprzez różnego rodzaju związki chemiczne obce w danym środowisku, które w stężeniach przekraczających granice tolerancji powodują destabilizację równowagi biologicznej, co w konsekwencji prowadzi do degradacji gleby (Huang i Shindo, 2000; Kucharski i Wyszkowska, 2000). Poważny problem stanowią metale ciężkie, których nadmiar ogranicza procesy biochemiczne gleby. Proces ten jest następstwem zmniejszenia liczebności makro- i mikroorganizmów glebowych (Kucharski i Wyszkowska, 2004; Wyszkowska, i in., 2006a, b). Możliwość nieselektywnego transportu jonów metali ciężkich do komórki prowadzi do spowolnienia metabolizmu, a w efekcie do osłabienia obiegu niektórych biogenów (Barabasz, i in., 2002). Miedź i kadm posiadają zdolność tworzenia reaktywnych rodników, prowadząc w ten sposób do uszkodzenia DNA, indukując stres oksydacyjny, hamując główne systemy naprawcze DNA wywołując niestabilność genomu i akumulację krytycznych mutacji, dezaktywując kontrolę wzrostu komórek, deregulując proliferację komórek, peroksydację lipidów, uszczuplając liczbę protein bogatych w grupy sulfhydrylowe (-SH) (Valko, i in., 2005). Toksyczność cynku wynika z możliwości współdziałania z innymi metalami ciężkimi. Jest on odpowiedzialny za zakłócanie pracy mitochondrium. Potencjalna toksyczność cynku wymaga wysoce precyzyjnych mechanizmów kontroli homeostazy. Nietypowość tego metalu polega na braku aktywności redox (Sekler, 2007). Destrukcyjne oddziaływanie metali polega także na uszkodzeniu systemów kontroli regulowanych przez białka regulatorowe czy białka sygnałowe, do których zalicza się: rozwój komórki, apoptozę, regulację cyklu komórkowego. Poszczególne związki metali wykazują unikalne mechanizmy, takie jak: przerwanie adhezji „komórka-komórka” (kadm) (Beyersmann i Hartwig, 2008). Potwierdzeniem zmniejszenia liczebności bakterii oligotroficznych, koptotroficznych, celulolitycznych, amonifikacyjnych, immobilizujących azot, bakterii z rodzaju *Azotobacter* oraz promieniowców i grzybów są badania Wyszkowskiej i Kucharskiego (2003a, b), którzy zbadali wpływ cynku, miedzi i kadmu na populacje wyżej wymienionych grup drobnoustrojów. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu zanieczyszczenia gleby cynkiem, miedzią i kadmem na liczebność bakterii z rodzaju *Azotobacter*, organotrofów, oraz promieniowców z rodzaju *Streptomyces*.

Materials and Methods

Doświadczenie przeprowadzono w warunkach laboratoryjnych. Zmiennymi doświadczalnymi były: rodzaj metalu ciężkiego: miedź, cynk i kadm, stopień zanieczyszczenia gleby metalami ciężkimi: 120, 240, 480 mg (Zn, Cu, Cd)^{2+*}kg⁻¹ s.m. gleby oraz czas inkubacji próbek gleby: 7, 70, 140 i 280 dni. Cynk stosowano w postaci ZnCl₂; miedź – CuSO₄·5H₂O, kadm – CdCl₂·2H₂O. Materiał glebowy pobrano z poziomu orno-próchniczego gleb brunatnych typowych z Ośrodka Dydaktyczno-Doświadczalnego w Tomaszowie (okolice Olsztyna, województwo warmińsko-mazurskie).

Uwzględniając klasyfikację uziarnienia według United States Department of Agriculture była to gleba o składzie granulometrycznym piasku gliniastego.

Właściwości fizykochemiczne przedstawiały się następująco: pH_{KCl} 6.6, zawartość piasku: 72%, pyłu: 21%, ilu: 7%, zawartość węgla organicznego: C_{org} – 5,05 g*kg⁻¹.

Przed założeniem doświadczenia materiał glebowy nie był nawożony mikro i makroskładnikami. Obiekty badawcze o masie 100 g powietrznie suchej gleby zostały założone w trzech powtórzeniach. Po wymieszaniu gleby z wodnymi roztworami cynku, kadmu i miedzi przeniesiono ją do szklanych pojemników i umieszczono w inkubatorze w temperaturze 25°C. Podczas inkubacji próbek utrzymywano stałą wilgotność gleby na poziomie 50% kapilarnej pojemności wodnej przy użyciu wody destylowanej. Po określonym czasie inkubacji przeprowadzono analizy mikrobiologiczne. Na zakres analiz mikrobiologicznych składało się określenie liczebności bakterii organotroficznych, bakterii z rodzaju *Azotobacter* oraz promieniowców z rodzaju *Streptomyces* przy pomocy licznika kolonii i podano je jako jtk w 1 g s.m. gleby. Liczebność mikroorganizmów określono metodą płytkową w trzech powtórzeniach. Ogólną liczbę bakterii organotroficznych określono na podłożu wg Bunta i Roviry, (1955) o następującym składzie: ekstrakt drożdżowy – 1.0 g; pepton – 1.0 g; KH₂PO₄ – 0.4 g; CaCl₂ – 0.1 g; (NH₄)₂SO₄ – 0.5 g; MgSO₄·7H₂O – 0.5 g; sól Mohra – 0.03 g; MgCl₂ – 0.2 g; FeCl₂ – 0.01 g; wyciąg glebowy – 250 cm³; agar – 20.0 g; H₂O – 750 cm³; promieniowców z rodzaju *Streptomyces* na podłożu Kustera i Williamsa z dodatkiem antybiotyków - nystatyny oraz actidionu w ilości 0.05 g rozpuszczonych w 100 cm³ sterylnej wody (w modyfikacji Parkinsona, (1971): skrobia ziemniaczana – 10.0 g; kazeina – 0.3 g; KNO₃ – 2.0 g; NaCl – 2.0 g; K₂HPO₄ – 2.0 g; MgSO₄·7H₂O – 0.05 g; CaCO₃ – 0.02 g; FeSO₄ – 0.01 g; agar – 20.0 g; H₂O – 1000 cm³; a *Azotobacter* na podłożu wg Fenglerowej, (1965): K₂HPO₄ – 1.5 g; MgSO₄·7H₂O – 0.3 g; NaCl – 0.3 g; FeSO₄·7H₂O – 0.005 g; MnSO₄·7H₂O – 0.005 g; (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O – 0.005 g; sacharoza – 10 g; NH₄NO₃ – 0.2 g; agar – 14 g; H₂O - 1000 cm³; Otrzymane wyniki opracowano statystycznie z wykorzystaniem analizy wariancji wieloczynnikowej ANOVA stosując test rozstępu Duncana o poziomie istotności przewidzianym dla badań laboratoryjnych wynoszącym p<0.01 przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA (StatSoft, 2010). Ponadto określono współczynniki korelacji między stopniem zanieczyszczenia gleby poszczególnymi metalami ciężkimi a liczebnością bakterii organotroficznych, *Azotobacter* i promieniowców z rodzaju *Streptomyces*.

Results

Wśród bakterii z rodzaju *Azotobacter* wiążących azot cząsteczkowy z atmosfery odnotowano istotne zmniejszenie się ich liczebności pod wpływem zanieczyszczenia gleby cynkiem, miedzią i kadmem (Table 1.).

Table 1. The number of *Azotobacter* in soil contaminated with heavy metals cfu* g^{-1} D.M. soilTabela 1. Liczebność bakterii z rodzaju *Azotobacter* w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi jtk* g^{-1} s.m. gleby

Dose [mg Cu, Cd, Zn] ^{2+*} kg ⁻¹	Incubation time [days]			
	7	70	140	280
0	40.79	57.21	35.60	26.21
Copper				
120	15.18	13.31	12.06	6.39
240	0.00	2.83	5.66	3.25
480	0.00	0.00	0.00	0.00
Mean	13.99	18.34	13.33	8.96
r	-0.84	-0.80	-0.87	-0.83
Cadmium				
120	26.61	24.55	24.45	24.15
240	0.00	0.00	0.00	0.00
480	0.00	0.00	0.00	0.00
Mean	16.85	20.44	15.01	12.59
r	-0.88	-0.85	-0.88	-0.86
Zinc				
120	39.38	51.24	24.83	18.28
240	38.63	19.49	2.83	0.00
480	1.40	0.00	0.00	0.00
Mean	30.05	31.99	15.82	11.12
r	-0.90	-0.97	-0.91	-0.88
*LSD _{0.01}	a – 1.57; b – 1.82; c – 1.82; a*b – 3.15; b*c – 3.64; a*c – 3.15; a*b*c – 6.31			

* LSD_{0.01} for: a – kind of heavy metal, b – dose of heavy metal, c – incubation time, n.s. – not significant

Z analizy statystycznej otrzymanych rezultatów wynika, że już najmniejsza dawka wszystkich testowanych metali ciężkich (120 mg*kg⁻¹ s.m. gleby) przyczyniła się do istotnego zmniejszenia liczby tych mikroorganizmów. Średnio, niezależnie od czasu inkubacji próbek glebowych, miedź ograniczała ich namnażanie o 70.31%, kadm – 32.75%, a cynk o 18.60%. Zaaplikowanie do gleby większych ilości metali ciężkich powodowało jeszcze większe zakłócenia w namnażaniu się tych drobnoustrojów. W konsekwencji, 480 mg Cu^{2+*}kg⁻¹ s.m. gleby i 480 mg Cd^{2+*}kg⁻¹ s.m. gleby spowodowało całkowite zahamowanie ich wzrostu, a 480 mg Zn^{2+*}kg⁻¹ s.m. gleby - ograniczenie liczby *Azotobacter* o 99.1%.

Azotobacter wykazywały największą wrażliwość na jony miedzi, a następnie kadmu i cynku. Porównując współczynniki korelacji pomiędzy stopniem zanieczyszczenia gleby a liczbą bakterii, najwyższe wartości stwierdzono dla cynku r = -0.97 (70 dni), następnie kadmu r = -0.88 (7 i 140 dni) i miedzi r = -0.87 (140 dni). Również czas inkubacji gleby istotnie modyfikował liczebność bakterii *Azotobacter* zarówno w

próbkach niezanieczyszczonych jak i zanieczyszczonych cynkiem, kadmem i miedzią. Największą liczebność tych drobnoustrojów stwierdzono w 70 dniu trwania doświadczenia, a najmniejszą w 280 dniu.

Nieco mniejszą wrażliwość na inhibycyjne działanie metali ciężkich prezentowały bakterie organotroficzne (Table 2.). Są to bakterie należące do organizmów wykorzystujących związki organiczne takie jak białka, tłuszcze czy węglowodany jako źródło węgla i energii.

Table 2. The number of organotrophic bacteria in soil contaminated with heavy metals 10^6 cfu \cdot g $^{-1}$ D.M. soil

Tabela 2. Liczebność bakterii czerpiących energię z rozkładu materii organicznej w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi 10^6 jtk \cdot g $^{-1}$ s.m. gleby

Dose [mg Cu, Cd, Zn] $^{2+}$ kg $^{-1}$	Incubation time [days]			
	7	70	140	280
0	37.30	31.78	4.54	1.42
Copper				
120	28.24	28.28	1.76	2.13
240	14.43	24.74	1.77	2.00
480	11.21	5.66	0.71	2.04
Mean	22.80	22.62	2.20	1.90
r	-0.92	-0.97	-0.86	0.61
Cadmium				
120	16.18	3.18	3.14	2.11
240	9.41	1.06	2.88	1.78
480	33.73	13.79	1.40	1.06
Mean	24.16	12.45	2.99	1.59
r	0.01	-0.37	-0.98	-0.53
Zinc				
120	17.39	17.32	1.42	1.41
240	14.18	15.59	0.35	1.40
480	12.02	6.36	0.31	1.38
Mean	20.22	17.76	1.66	1.40
r	-0.80	-0.94	-0.81	-0.99
*LSD $_{0.01}$	a – n.s.; b – 3.87; c – 3.86; a*b – 6.69; a*c – n.s.; b*c – 7.72; a*b*c – 13.38			

* explanations as in Table 1

Przedstawicielami bakterii korzystających z organicznych źródeł elektronów, są m. in.: *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Cytophaga*, *Myxococcus*, *Sporocytophaga*. Zmniejszenie tempa wzrostu drobnoustrojów generowane było stopniem zanieczyszczenia gleby, co potwierdzają wyniki analizy statystycznej ANOVA. Najmniejsze spustoszenie w populacji bakterii

organotroficznych przy uwzględnieniu trzech terminów analiz (7, 70, 140 dni), wywołały najniższe dawki cynku i miedzi oraz najwyższa dawka kadmu, zmniejszając liczebność w przypadku miedzi o 32.17%, cynku – o 55.86%, kadmu – 45.11%. Liczebność bakterii organotroficznych w 280 dniu inkubacji w próbkach gleby zanieczyszczonych miedzią wzrosła w porównaniu z próbkami, które nie zostały poddane presji metali ciężkich o 44.83%. Wyniki analiz sugerują możliwość nabycia oporności przez nowe generacje bakterii. Namnażanie się kolonii bakterii organotroficznych odnotowano również w próbkach gleby zanieczyszczonych kadmem. W próbkach poddanych inkubacji przez 280 dni liczba bakterii organotroficznych wzrosła o 48.59% w obiektach zanieczyszczonych 120 mg $\text{Cd}^{2+}\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby i 25.35% w próbkach z dodatkiem 240 mg $\text{Cd}^{2+}\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby. Zastosowanie najwyższych dawek miedzi i cynku w 70 i 140 dniu trwania doświadczenia doprowadziło do ograniczenia liczebności bakterii organotroficznych o 78.86 % i 80.31%. Wrażliwość bakterii organotroficznych wobec zastosowanych metali ciężkich układu się następująco: cynk>kadm>miedź. Zależność tą potwierdzają współczynniki korelacji między stopniem zanieczyszczenia a liczbą kolonii, które wynoszą odpowiednio dla cynku $r = -0.99$, dla kadmu $r = -0.98$, a dla miedzi $r = -0.97$. Promieniowce okazały się najmniej podatne na stres wywołany zanieczyszczeniem gleby metalami ciężkimi. W odniesieniu do wyżej omawianych drobnoustrojów szereg wrażliwości u promieniowców układu się następująco: miedź > cynk > kadm. Potwierdzeniem tego są współczynniki korelacji między stopniem zanieczyszczenia gleby a liczebnością promieniowców wynoszące dla miedzi $r = -0.83$ (140 dni), dla cynku $r = -0.82$ (140 dni) i dla kadmu $r = -0.73$ (70 dni). Wyniki analizy statystycznej ANOVA wskazują na wagę dawki i czasu inkubacji w kształtowaniu liczebności populacji promieniowców z rodzaju *Streptomyces*. Istotne zmniejszenie liczby promieniowców pod wpływem nadmiernych ilości kadmu odnotowano w próbkach gleby inkubowanych przez 70 dni. W pozostałych terminach kadm nie tylko nie ograniczał liczebności promieniowców, ale stymulował ich wzrost (Table 3.). Zanieczyszczenie gleby cynkiem w ilości 480 mg $\text{Zn}^{2+}\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby powodowało ograniczenie wzrostu populacji promieniowców po 70 i 140 dniach trwania doświadczenia o 69.4% i 34.77% w porównaniu do kontroli. Natomiast w pozostałych terminach (7 i 280 dni) w próbkach zanieczyszczonych najniższą dawką (120 mg $\text{Zn}^{2+}\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby) stwierdzono istotny wzrost liczby promieniowców. Miedź zaaplikowana w dawkach 240 i 480 mg $\text{Cu}^{2+}\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby ograniczała wzrost promieniowców w próbkach gleby inkubowanych przez 7 i 140 dni odpowiednio o 45.48 i 21.08%. W pozostałych terminach miedź stymulowała namnażanie się promieniowców. Ich liczebność, niezależnie od stopnia zanieczyszczenia gleby, wzrosła o 18.80% w próbkach inkubowanych przez 70 dni i o 6.58% - po 280 dniach trwania doświadczenia.

Table 3. The number of *Streptomyces* in soil contaminated with heavy metals 10^5 cfu* g^{-1} D.M. soilTabela 3. Liczebność promieniowców z rodzaju *Streptomyces* w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi 10^5 jtk* g^{-1} s.m. gleby

Dose [mg Cu, Cd, Zn] $^{2+}$ * kg^{-1}	Incubation time [days]			
	7	70	140	280
0	14.29	52.97	37.45	10.98
		Copper		
120	17.20	71.72	21.09	12.78
240	7.74	70.34	14.09	11.07
480	7.84	46.73	13.45	11.26
Mean	11.77	60.44	21.52	11.52
r	-0.75	-0.37	-0.83	-0.16
		Cadmium		
120	18.64	18.74	16.75	27.39
240	52.64	13.79	45.42	21.02
480	31.29	14.49	34.19	16.68
Mean	29.22	25.00	28.45	19.02
r	0.51	-0.73	0.63	0.09
		Zinc		
120	39.06	18.73	27.67	22.85
240	11.70	16.30	25.41	21.39
480	11.34	16.21	24.43	13.18
Mean	19.10	26.05	28.74	17.10
r	-0.38	-0.72	-0.82	-0.04
* LSD _{0,01}	a – n.s.; b – 6.76; c – 6.76; a*b – 11.71; a*c – 11.71; b*c – 13.52; a*b*c – 23.42			

* explanations as in Table 1

Discussion

Metale ciężkie należą do grupy związków naruszających homeostazę w środowisku glebowym (Seifert i Domka, 2005). Jeśli występują w nadmiarze ograniczają bioróżnorodność i liczebność drobnoustrojów (Jing, i in., 2007, Wyszowska, i in., 2006a, b). Szkodliwy wpływ metali w dużym stopniu zależy od ich mobilności w środowisku oraz biodostępności. Na biodostępność składa się wiele czynników takich jak kwasowość środowiska, zawartość materii organicznej, skład granulometryczny i mineralogiczny gleby (Leita, i in., 1995; Schinner i Klauser, 2005). Toksyczność metali ciężkich raportowana jest wobec wszystkich organizmów żywych. Znany jest ich negatywny wpływ na wzrost, morfologię czy metabolizm już na poziomie komórkowym. Metale ciężkie wywołują między innymi denaturację białka (enzymy), niszczenie integralności błon komórkowych, hamowanie procesów metabolicznych (Giller, i in., 1998; Gasic i Korban, 2006). Mikroorganizmy glebowe, jako istotny składnik większości ekosystemów, odgrywają kluczową rolę w środowisku z powodu

ich udziału w obiegu pierwiastków biogenych czy mineralizacji materii organicznej (Wardle i Ghani, 1995). Liczebność drobnoustrojów w glebie uzależniona jest od wielu chemicznych i fizycznych właściwości gleby (np. pH gleby, składu granulometrycznego, zawartości próchnicy) (Borowik, i in., 2011). W przypadku gleb rolniczych, oddziaływania wyżej wymienionych czynników modyfikowane są przez liczne zabiegi agrotechniczne związane z uprawą roślin, a zwłaszcza nawożenie, czy stosowanie chemicznych środków ochrony roślin uprawnych (Wyszkowska, i in., 2009). Stres wywołany obecnością metali ciężkich na ogół zmniejsza różnorodność oraz aktywność mikroorganizmów glebowych. Niewątpliwie efekty wywołane szkodliwością metali są bardzo trudne do scharakteryzowania (Barros, i in., 2003). Wang, i in., (2010) raportowali, na podstawie badań nad toksycznością metali ciężkich, o ich negatywnym wpływie na tempo wzrostu drobnoustrojów, entalpię metaboliczną oraz inne parametry bezpośrednio związane z aktywnością drobnoustrojów glebowych. Podkreślono, iż nie wszystkie rozpatrywane metale działały na tym samym poziomie toksyczności. Uwzględniając wartości entalpii przemiany materii, Wang, i in., (2010) zaszeregowali metale pod względem rosnącej toksyczności w następujący sposób: $\text{Cr} > \text{Pb} > \text{As} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Cu}$. Uzyskane wyniki z badań własnych potwierdzają, że toksyczność jonów cynku, kadmu i miedzi układu się w podobnej kolejności w odniesieniu do liczebności bakterii organotroficznych. Niekorzystne oddziaływanie metali ciężkich polega nie tylko na zachwianiu liczebności drobnoustrojów w glebie, ale również na obniżeniu ich bioróżnorodności, co udowodnili Moffet, i in., (2003). Wykazali oni, że narażenie mikroorganizmów glebowych na obecność cynku w środowisku wywołuje 25% zmniejszenie ilości grup taksonomicznych w glebach zanieczyszczonych $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gleby w porównaniu do gleby kontrolnej, charakteryzującej się naturalną zawartością cynku ($57 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gleby).

Według Zaborowskiej, i in., (2006) inhibicyjne działanie cynku zależy od poziomu zanieczyszczenia oraz formy w jakiej występuje w środowisku. Autorzy zwracają szczególną uwagę na dawkę cynku wynoszącą $400 \text{ mg Zn}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. gleby jako dawkę o wyraźnie negatywnym działaniu. Potwierdzają to również badania Górskiej, i in. (2008), którzy stwierdzili negatywne oddziaływanie cynku na liczebność bakterii, promieniowców oraz grzybów wraz ze wzrostem jego dawek. W badaniach własnych stwierdzono, że statystycznie istotne okazało się zarówno zanieczyszczenie 120 jak i $480 \text{ mg Zn}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}$ s.m. gleby. Szczególnie wrażliwe okazały się bakterie z rodzaju *Azotobacter*. Natomiast wyniki uzyskane dla bakterii organotroficznych i *Streptomyces*, wskazują, iż mimo zmniejszania się liczby drobnoustrojów w próbkach zanieczyszczonych $480 \text{ mg Zn}^{2+} \cdot \text{kg}^{-1}$ następuje nawet przyrost liczby badanych bakterii. Promieniowce cechują się swoistą opornością wobec metali ciężkich i dopiero wysokie stężenie metali ciężkich wywołuje załamanie liczebności populacji (Zaborowska, i in., 2006). Miedź uznano za jeden z najbardziej toksycznych analizowanych pierwiastków śladowych, która podobnie jak cynk, naruszała równowagę mikrobiologiczną gleby. Również Kucharski, i in., (2004) zaobserwowali inhibicyjne oddziaływanie miedzi na bakterie i promieniowce. Najbardziej wrażliwą grupą na zanieczyszczenie jonami miedzi była populacja bakterii z rodzaju *Azotobacter*. Już pierwsze zastosowane dawki metalu spowodowały obniżenie się liczebności bakterii z rodzaju *Azotobacter* o 70.31% w porównaniu z próbkami gleby nie poddanymi presji miedzi. Natomiast dawka $480 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ wywołała całkowite zahamowanie wzrostu tych bakterii. Podobne wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych przez Kucharskiego, i in., (2000), aczkolwiek w przedstawionym doświadczeniu dawką prawie w 100 % hamującą rozwój *Azotobacter* było 80 – 100

mg $\text{Cu}^{2+}\text{kg}^{-1}$ s.m. gleby. Analizując wyniki doświadczenia stwierdzono również, że miedź była zdolna do stymulacji wzrostu bakterii organotroficznych.

Najprawdopodobniej mogło dojść do wytworzenia pewnych mechanizmów adaptacyjnych wywołanych długotrwałym stresem środowiskowym jak donosi Sullivan, i in., (2013). Kadm należy do metali, które nie pełnią potwierdzonych funkcji w procesach życiowych (Lasat, 2002). Metal ten jest silnie toksyczny, dlatego też ograniczenia jego zawartości w glebie są bardzo restrykcyjne. Kadm można zaliczyć do najbardziej niebezpiecznych pierwiastków śladowych. W omawianych badaniach, najbardziej negatywnie na jony kadmu w środowisku zareagowały bakterie z rodzaju *Azotobacter*. O negatywnym wpływie kadmu na drobnoustroje glebowe raportują również Gogolev i Wilke, (1997). Zastosowali oni w swoich badaniach od 0 do 25 mg $\text{Cd}^{2+}\text{kg}^{-1}$ s.m. i stwierdzili ujemną korelację między dawką kadmu a liczebnością bakterii. Pozostałe grupy drobnoustrojów cechowała wyższa tolerancja na poziom zanieczyszczenia kadmem. Największą opornością charakteryzowały się promieniowce. Potwierdzeniem oporności tej grupy drobnoustrojów na negatywne oddziaływanie kadmu na mikroorganizmy glebowe jest doświadczenie przeprowadzone przez Wyszowską i Kucharskiego, (2003a, b). Bardzo silne zanieczyszczenie badanych gleb kadmem zmniejszało liczebność wszystkich bakterii, natomiast w przypadku promieniowców i grzybów efekt był odwrotny. W badaniach własnych szereg drobnoustrojów w kierunku rosnącej odporności na metale ciężkie wygląda następująco: *Azotobacter* < bakterie organotroficzne < promieniowce. Znaczącą rolę w zmianach liczebności mikroorganizmów środowiska glebowego odgrywał czas narażenia na ksenobiotyk. Według Piotrowskiej – Seget, i in., (2005) wrażliwość na szkodliwe działanie ksenobiotyków jest cechą gatunkową. Burns, i in., (2006) sklasyfikowali zmienność liczebności drobnoustrojów w czasie na:

- normalną, jeżeli populacja wraca do normy po 30 dniach od momentu ustania oddziaływania czynnika szkodliwego,
- dopuszczalną, jeśli czas potrzebny do regeneracji populacji trwa 60 dni,
- będącą wynikiem stresu, gdy czas regeneracji jest dłuższy niż 90 dni.

Limitowanie tworzenia się nowych populacji mikroorganizmów ma swoje podłoże w otaczającym je środowisku glebowym oraz warunkach, jakie w nim występują. Na biodostępność metali ciężkich i ich toksyczne oddziaływanie na drobnoustroje ma wpływ wiele czynników. Intensywność hamowania liczebności mikroorganizmów testowych warunkują także właściwości fizykochemiczne gleby.

Conclusions

1. Największą wrażliwość na zanieczyszczenie gleby miedzią, kadmem i cynkiem wykazały bakterie z rodzaju *Azotobacter*, a najmniejszą promieniowce z rodzaju *Streptomyces*
2. Toksyczność jonów cynku, miedzi i kadmu w zależności od grupy drobnoustrojów przedstawia się w następujący sposób:
 - *Azotobacter* sp.: $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$;
 - bakterie organotroficzne: $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$;
 - *Streptomyces* sp.: $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$.
3. Najbardziej destrukcyjny wpływ na liczebność badanych drobnoustrojów miały jony Cu^{2+} .

References

- Baćmaga, M., Kucharski, J., Wyszowska, J., (2007) Wpływ środków ochrony roślin na aktywność mikrobiologiczną gleby. *Journal of Elementology*, 12(3), 225-239.
- Barabasz, W., Albinska, D., Jaskowska, M., Lipiec, J., (2002) Biological effects of mineral nitrogen fertilization on soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 11(3), 193-198.
- Barros, N., Feijóo, S., Fernández, S., (2003) Microcalorimetric determination of the cell specific heat rate in soils: relationship with the soil microbial population and biophysic significance, *Thermochimica Acta*, 406, 161–170.
- Beyersmann, D., Hartwig, A., (2008) Carcinogenic metal compounds: recent insights into molecular and cellular mechanisms. *Archives of Toxicology*, 82, 493–512.
- Boros, E., Baćmaga, M., Wyszowska, J., Kucharski, J., (2010) Wpływ zanieczyszczenia gleby niklem na liczebność drobnoustrojów glebowych. *Nauka Przyroda Technologia* 4(6), 71.
- Borowik, A., Wyszowska, J., Kucharski, M., (2011) Wpływ temperatury gleby na drobnoustroje. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 567, 55-67.
- Brzezińska, M., (2009) Wykorzystanie ekofizjologicznych wskaźników mikrobiologicznych do oceny jakości gleby. *Postępy Nauk Rolniczych*, 1, 39-51.
- Bunt, J. S., Rovira, A. D., (1955) Microbiological studies of some subantarctic soils. *Journal of Soil Science*, 6, 119-28.
- Burns, R. G., Nannipieri, P., Benedetti, A., Hopkins, D. W., (2006) Defining soil quality. In: *Microbiological methods for assessing soil quality*. CABI Publishing, 15-22.
- Fenglerowa, W., (1965) Simple method for counting *Azotobacter* in soil samples. *Acta Microbiologica Polonica*, 14 (2), 203 – 206.
- Florencka, N., Chmiel, M., (2005) Wpływ zanieczyszczenia gleby różnymi związkami rtęci na aktywność mikrobiologiczną gleby. *Inżynieria Środowiska*, 10 (2), 207-212.
- Gasic, K., Korban, S. S., (2006) Heavy metal stress, in: K.V.M. Rao, A.S. Raghavendra, K.J. Reddy (Eds.), *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*, ss. 219–254.
- Giller, K. E., Witter, S., McGrath, S. P., (1998) Toxicity of heavy metals to microorganism and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(10/11), 1389 - 1414.
- Gogolev, A., Wilke B.M., (1997). Combination effects of heavy metals and fluoranthene on soil bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 25, 274-278.
- Gorlach, E., Gambuś, F., (2000) Potencjalnie toksyczne pierwiastki śladowe w glebach. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 427(1), 275-296.

- Górska, E. B., Kubasik R., Korc M., (2008) Microorganism Abundance in Selected Soils from the Huta Katowice Steel Mell Area. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 533, 131-137.
- Huang, Q., Shindo, H., (2000) Effect of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1885-1892.
- Jing, Y., He, Z., Yang, X., (2007) Role of rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8 (3), 192-207.
- Kucharski, J., Wyszowska, J., (2000) Microbiological properties of soil contaminated with chromium. *Polish Journal of Natural Sciences*, 7, 7-16.
- Kucharski, J., Hłasko A., Wyszowska, J., Jastrzębska, E., (2000) Reakcja drobnoustrojów i bobiku na zanieczyszczenie gleby miedzią. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 472, 449-455.
- Kucharski, J., Jastrzębska, E., Wyszowska, J., (2004) Liczebność drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej benzyną bezołowiową. *Acta Agraria et Silvestria. Series Agraria*, 42, 239-247.
- Kucharski, J., Wyszowska, J., (2004) Inter-relationship between number of microorganisms or spring barley yield and degree of soil contamination with copper. *Plant Soil Environmental*, 50(6), 243-249.
- Lasat, M. M., (2002) Phytoextraction of toxic metal: a review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality*, 31, 109–120.
- Leita, L., DeNobili, M., Muhlbachova, G., Mondini, C., Marchiol, L., Zerbi, G., (1995) Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biology and Fertility of Soils*, 19, 103–118.
- Moffet, B. F., Nicholson, F. A., Uwakwe, N. C., Chambers, B. J., Harris, J. A., Hill, T. C. J. (2003) Zinc Contamination Decreases the Bacterial Diversity of Agricultural Soil. *Microbiology Ecology*, 43, 13-19.
- Parkinson, D., Gray, F.R.G., Williams, S.T., (1971) Methods for studying the ecology of soil microorganism. *IBP Handb.* 19.
- Piotrowska-Seget, Z., Cycon, M., Kozdroj, J., (2005) Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 28, 237–246.
- Seifert, K., Domka, F., (2005) Inhibiting Effect of Surfactants and Heavy Metal Ions on the Denitrification Process. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(1), 87-93.
- Sekler, I., Sensi, S. L., Hershfinkel, M., Silverman, W. F., (2007) Mechanism and Regulation of Cellular Zinc Transport. *Molecular Medicine*, 13, 337 – 343.
- Schinner, F., Klausner, T., (2005) Feasibility studies for microbial remediation of metal-contaminated soil, in: R. Margesin, F. Schinner (Eds.), *Manual for Soil Analysis*.
- Schlöter, M., Dilly, O., Munch, J.C., (2003) Indicators for evaluating soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98, 255-262.

- Statsoft, Inc., Statistica. (2010) (data analysis software system), version 9.1.
www.statsoft.com
- Sullivan, T. S., McBride, M.B., Thies, J.E., (2013) Soil bacterial and archaeal community composition reflects high spatial heterogeneity of pH, bioavailable Zn, and Cu in a metalliferous peat soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 66, 102-109.
- Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D., (2005) Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 1161- 1208.
- Wang, F., Yao, J., Si, Y., Chen, H., Russel, M., Chen, K., Qian, Y., Zaray, G., Bramanti, E., (2010) Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity. *Journal of Hazardous Materials*, 173, 510–516.
- Wardle, D. A., Ghani, A., (1995) Why is the strength of relationships between pairs of methods for estimating soil microbial biomass often so variable. *Soil Biology and Biochemistry*, 2, 821–828.
- Wyszkowska, J., Kucharski, J., (2003a) Liczebność drobnoustrojów w glebie zanieczyszczonej metalami ciężkimi. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 492, 427-433.
- Wyszkowska, J., Kucharski, J., (2003b) Właściwości biochemiczne i fizykochemiczne gleby zanieczyszczonej metalami ciężkimi. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 492, 435-442.
- Wyszkowska, J., Kucharski, J., Lajszner, W., (2006a) The effects of copper on soil biochemical properties and its interaction with other heavy metals. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15 (6), 927–934.
- Wyszkowska, J., Zaborowska, M., Kucharski, J., (2006b) Activity of enzymes in zinc contaminated soil. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 9 (1), 06.
- Wyszkowska, J., Kucharski, J., Jankowski, K., Kijewski, Ł., (2009) Wpływ resztek pozbiorowych na aktywność enzymów glebowych. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 537, 403-412.
- Wyszkowski, M., Wyszkowska, J. (2004) Wpływ zanieczyszczenia gleby cynkiem, niklem, miedzią i ołowiem na plonowanie i gospodarkę makroelementami w owsie. *Journal of Elementology*, 9(1), 61-70.
- Zaborowska, M., Wyszkowska, J., Kucharski, J., (2006) Microbial activity in zinc contaminates soil of different pH. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(2a), 569-574.